

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

Prirodoslovno-matematički fakultet

BIOLOŠKI ODSJEK

Vladimir Ramljak

**UZGOJNE ZNAČAJKE PROTEOLITIČKIH
SULFID-PRODUCIRAJUĆIH BAKTERIJA NA
NOVOM TIPU HRANJIVE PODLOGE**

Diplomski rad

Zagreb, 2009.

Ovaj rad izrađen u Laboratoriju za mikrobiologiju Botaničkog zavoda Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu pod vodstvom doc. dr. sc. Jasne Hrenović predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja prof. biologije.

Zahvaljujem doc.dr.sc Jasni Hrenović na pomoći i strpljenju tokom izrade i pisanja ovog rada. Također zahvaljujem Renati Horvat i Tomislavu Ivankoviću na njihovoj pomoći tokom laboratorijskog dijela izrade ovoga rada te savjetima i odgovorima na moja brojna pitanja. Velika zahvala svim kolegicama i kolegama, mojim prijateljima te najbližima za svu pomoć i potporu koju su mi pružili tokom studija. Posebnu zahvalu upućujem svojoj Andreji.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

Uzgojne značajke proteolitičkih sulfid-producirajućih bakterija na novom tipu hranjive podloge

Vladimir Ramljak

Botanički zavod, Biološki odsjek

Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Rooseveltov trg 6, Zagreb

SAŽETAK

Proteolitičke sulfid-producirajuće bakterije (PSPB) široko su rasprostranjene u vodi i sedimentu i predstavljaju vrlo dobar pokazatelj ekološkog stanja ekosistema. S ekološkog gledišta važno je razlikovati fiziološku skupinu PSPB-a od ostalih skupina bakterija koje proizvode H_2S iz sulfata i tiosulfata. S tim ciljem razvijen je i iskušan novi tip podloge, pepton-cistein-amonijak-željezo citratni agar (PCA). Na tom je tipu podloge redovito dolazilo do stvaranja većeg broja PSPB bakterijskih kolonija nego na kontrolnoj podlozi (SIM). Za brojanje PSPB bakterijskih kolonija nastalih iz okolišnih uzoraka preporuča se simultana inkubacija istih uzoraka u aerobnim i anaerobnim uvjetima te bi za tumačenje rezultata trebalo uzeti veći broj nastalih kolonija.

(33 stranice, 10 slika, 4 tablice, 21 literaturni navod, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: proteolitičke sulfid-producirajuće bakterije, proizvodnja H_2S , voda, sediment

Voditelj: dr. sc. Jasna Hrenović

Ocjenitelji: dr. sc. Jasna Hrenović, dr. sc. Ivančica Ternjej, dr. sc. Zdravko Dolenec

Rad prihvaćen: 03.06.2009.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

Plate method for counting proteolytic sulphide-producing bacteria

Vladimir Ramljak

Division of Botany, Department of Biology
Faculty of Science University of Zagreb
Rooseveltova trg 6, Zagreb

ABSTRACT

The proteolytic sulphide-producing bacteria (PSPB) are widely distributed in the water and sediment and are a good indicator of the ecological status of ecosystems. From the ecological point of view it is important to distinguish the physiological group of PSPB from other bacteria producing H₂S from sulphate or thiosulphate. A new medium named peptone-cysteine-ammonium-iron citrate agar (PCA) was developed and tested. The medium regularly gave higher CFU of PSPB than the used control medium (SIM). For the enumeration of PSPB from environmental samples, simultaneous incubation of the same samples in aerobic and anaerobic conditions is recommended and a higher number should be taken for interpretation.

(33 pages, 10 figures, 4 tables, 21 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in Central biological library

Key words: plate count, proteins, putrefaction, sediment, sulphide-producing bacteria, water

Supervisor: dr. sc. Jasna Hrenović

Reviewers: dr. sc. Jasna Hrenović, dr. sc. Ivančica Ternjej, dr. sc. Zdravko Dolenec

Thesis accepted: 03.06.2009.

Popis kratica:

CFU – *colony forming units*, broj poraslih bakterijskih kolonija

PCA – pepton-cistein-amonij-željezov citratni agar

PSPB – proteolitičke sulfid-producirajuće bakterije

SIM – *sulphide production, indol formation and motility*, podloga za otkrivanje stvaranja sulfida, indola te opažanje pokretljivosti bakterija

SADRŽAJ RADA:

1. UVOD	1
1.1. Značaj sumpora za živi svijet	2
1.2. Kruženje sumpora	4
1.3. Sudjelovanje mikroorganizama u procesima kruženja sumpora u prirodi	5
1.4. Određivanje prisutnosti sumporovodika na hranjivim podlogama	7
1.5. Bakterijski rodovi uključeni u stvaranje sumporovodika (H ₂ S) iz proteina	8
2. MATERIJALI I METODE	11
2.1. Okolišni uzorci	11
2.2. Podloga	11
2.3. Eksperimentalne metode	12
2.4. Analiza podataka	13
3. REZULTATI	14
3.1. Porasle bakterijske kolonije (CFU) na testiranim podlogama	14
3.2. Mikroskopska i biokemijska analiza poraslih PSPB-a	24
3.3. Determinacija bakterijskih rodova pomoću API 20E kompleta	25
4. RASPRAVA	27
5. ZAKLJUČAK	31
6. POPIS LITERATURE	32

1. UVOD

Procesi razgradnje proteina pomoću bakterija imaju važnu ulogu u mineralizaciji organskog materijala. Brojne bakterije razgrađuju proteinske spojeve do produkata kao što su amonijak, sumporovodik i merkaptani. Mineralizacija proteina odvija se u vodenoj sredini i u bentičkim sedimentima u aerobnim i anaerobnim uvjetima.

Organsku tvar, nakon što postane dostupna, mogu iskoristiti mnogi organizmi. Prije spomenuta mineralizacija predstavlja proces razgradnje organske tvari tijekom kojeg nastaju jednostavnije, anorganske komponente. Mikroorganizmi imaju važnu ulogu u funkcioniranju prirodnih okoliša. U tim okolišima oni obavljaju mnoge zadaće, od kojih su samo neke ovdje navedene:

- Razgradnja (mineralizacija) organskih supstrata,
- Izvor hrane bogate nutrijentima drugim kemoheterotrofnim mikroorganizmima; Kao rezultat pojavljuju se transformacije organskih tvari u njihove mineralne oblike,
- Izvor hrane praživotinjama, oblicima, kukcima koji žive u tlu te tako pomažu u oblikovanju hranidbenih mreža,
- Mijenjaju tvari kako bi ih drugi organizmi mogli iskoristiti,
- Mijenjaju količinu tvari dostupne u topivom i plinovitom obliku; Taj se proces odvija ili izravno kroz njihov metabolizam ili neizravno promjenama njihova okoliša,
- Proizvodnja inhibitornih tvari koje smanjuju mikrobiološku aktivnost ili ograničavaju preživljavanje i funkcioniranje biljaka i životinja.

Razgradnja raspadajuće organske tvari posredstvom heterotrofnih bakterija, u vodi i ekosistemima sedimenata, važan je korak u kruženju sumpora u prirodi. Jedan od glavnih ciljeva proučavanja mikrobiologije okoliša jest identifikacija i opisivanje mikroorganizama koji predvode transformacije u prirodnim ekosustavima. Tijekom mnogih istraživanja prikupljeni su podaci koji ukazuju na činjenicu kako glavnim biogeokemijskim procesima u

tlu, sedimentu i pelagičkim okolišima posreduju mikroorganizmi koji pokazuju još nepoznata fiziološka svojstva. Ti mikroorganizmi mogu biti potpuno novi, još neuzgojeni tipovi ili vrste koje pokazuju drugačija fiziološka svojstva u svom prirodnom okruženju od onih koja prikazuju uzgojeni u čistim laboratorijskim kulturama. Za detaljna proučavanja takvih fizioloških svojstava preduvjet je izolacija ekološki značajnih bakterija.

Međutim, nemogućnost uzgoja tih vrsta mikroorganizama predstavlja jedan od najvećih problema istraživanja mikrobiologije okoliša. Budući da je oko 50%, a u nekim slučajevima i do 90%, bakterijskih stanica uzetih iz prirodnog okruženja metabolički aktivno, pretpostavka je kako bi se one mogle uzgojiti i u laboratorijskim uvjetima. No situacija u laboratoriju je posve drugačija. Samo mali djelić prije navedenog broja, otprilike 1%, moguće je uspješno uzgojiti. Problem koji se pojavljuje kod većine pokušaja uzgoja takvih tipova bakterija jest da se zbog vrlo specifičnih uvjeta rasta samo nekoliko metaboličkih tipova bakterija uspješno uzgaja u laboratoriju (Overmann i Gernerden 2000). Uobičajene metode uzgoja stoga nisu pogodne te se mora pristupiti razvoju novih metoda odnosno hranjivih podloga te drugih medija koji će što vjernije replicirati prirodni okoliš tih vrsta bakterija.

Stoga je razvoj novog tipa hranjive podloge koja omogućava rast i razvoj fiziološke skupine proteolitčkih sulfid-producirajućih bakterija značajan korak u smjeru dobivanja novih spoznaja o ekologiji i karakteristikama te skupine bakterija. Tijekom raspadanja proteina određena količina sumporovodika se oslobađa iz aminokiselina koje sadržavaju sumpor u svom sastavu (organski sumpor). U aerobnim uvjetima spojevi koji sadrže organski sumpor mineraliziraju se do sulfata, a u anaerobnim uvjetima konačni produkt je sumporovodik (Fenchel i sur. 1998).

1.1. Značaj sumpora za živi svijet

Sumpor predstavlja sastavni građevni dio živih stanica. Anorganski sumpor sudjeluje u stvaranju nakupina željezo-sumpor koje su sastavni dio kompleksa citokrom c-oksidge, kompleksa uključenog u iskorištavanje kisika kod aerobnih organizama.

Sumpor može poslužiti kao izvor kemijske hrane primitivnim organizmima. Neke bakterije koriste sumporovodik (H_2S) umjesto vode kao donor elektrona kod primitivnih procesa nalik

fotosintezi kod kojih je kisik akceptor elektrona. Fotosintetske zelene i ljubičaste sumporne bakterije, kao i neki kemolitotrofi, koriste elementarni kisik za procese oksidacije sumporovodika do elementarnog sumpora (S^0). Primitivne bakterije koje žive u blizini dubokomorskih vulkanskih izvora oksidiraju sumporovodik na taj način. S druge strane, sumporne bakterije „udišu sumpor“ umjesto kisika. One koriste sumpor kao akceptor elektrona te reduciraju sumporne spojeve do sulfida, često i do sumporovodika. Takve bakterije mogu rasti na raznim podlogama na kojima se nalaze djelomično oksidirani sumporni spojevi, primjerice tiosulfati, tionati, polisulfidi te sulfiti. Sumporovodik kojeg su ove bakterije proizvele odgovoran je za miris plinova i produkata razgradnje i raspadanja čemu ove bakterije posreduju.

Sumpor je također sastavni dio mnogih molekula koje služe kao obrambeni mehanizmi bakterija. Primjerice, iako sumpor nije dio laktamskog prstena, sastavni je dio većine beta-laktamskih antibiotika, uključujući penicilin, cefalosporin i monobaktam.

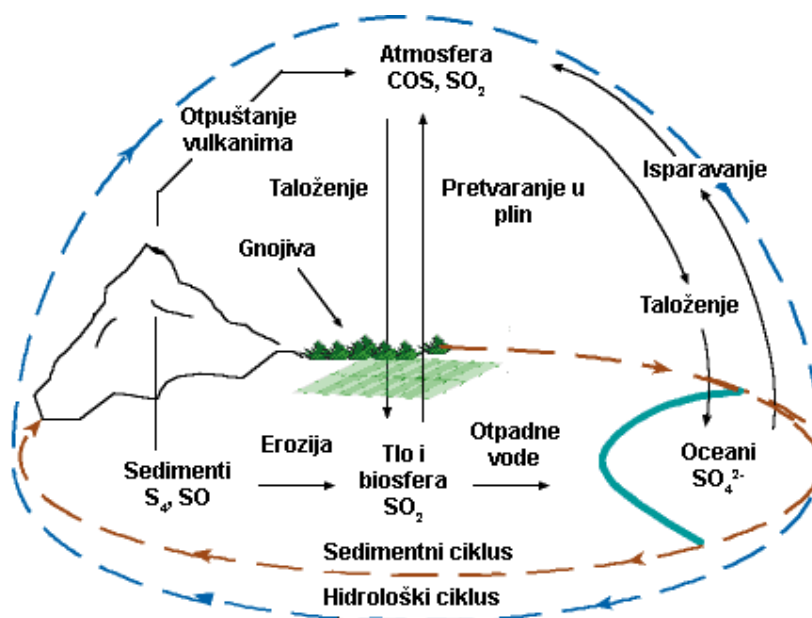
Biljke apsorbiraju sumpor iz zemlje preko korijenovog sustava u obliku sulfatnog iona (SO_4^{2-}) te ga reduciraju do sulfida prije nego ga ugrade u aminokiselinu cistein i ostale organske komponente koje sadrže sumpor. U biljaka i životinja aminokiseline cistein i metionin sadrže sumpor, kao i svi polipeptidi, proteini te enzimi koji u svom sastavu imaju spomenute aminokiseline. Homocistein, taurin i drugi spojevi također sadrže sumpor te su slične strukturne građe, no njih ne kodira DNK te stoga nisu dio primarne strukture proteina. Glutation je važan tripeptid koji sadrži sumpor koji služi kao izvor kemijskog redukcijskog potencijala posredstvom svojeg sulfhidrilnog dijela (-SH). Mnogi važni stanični enzimi koriste prostetičke skupine koje sadrže -SH dijelove kako bi mogle sudjelovati u reakcijama u kojima su prisutne biokemikalije s acilnim komponentama. Dva primjera takvih metaboličkih interakcija su koenzim A i alfa-lipoidna kiselina.

Disulfidni mostovi (S-S) stvoreni između dviju aminokiselina cisteina u peptidnom lancu imaju važnu ulogu u sastavljanju i strukturi proteina. Ove jake kovalentne veze između peptidnih lanaca daju proteinima dodatnu strukturnu čvrstoću i otpornost. Primjerice, čvrstoća perja i dlaka dijelom je posljedica visokog udjela S-S veza u njihovu sastavu te visokog udjela cisteina i sumpora.

1.2. Kruženje sumpora

Sumpor (S), deseti po zastupljenosti element u svemiru, krhak je žuti nemetal bez okusa i mirisa. Sastavni je dio mnogih vitamina, proteina i hormona koji imaju važnu ulogu kao klimatski i regulatorni faktor u ekosistemima. Većina sumpora na Zemlji uskladištena je u podzemnim nakupinama stijena i minerala, uključujući i sulfatne soli zakopane duboko unutar oceanskih sedimenata.

Kruženje sumpora uključuje atmosferske procese te procese koji se odvijaju na zemljinoj površini. Unutar procesa na zemljinoj površini kruženje započinje trošenjem stijena, oslobađajući uskladišteni sumpor. Sumpor tada dolazi u doticaj sa zrakom prilikom čega se pretvara u sulfat (SO_4). Taj sulfat uzimaju biljke i mikroorganizmi te ga svojim asimilacijskim procesima pretvaraju u organski oblik koji životinje koriste u obliku hrane koju uzimaju iz okoliša, te one tako pospješuju kretanje sumpora kroz hranidbene lance. Kako organizmi ugibaju te se raspadaju, dio sumpora se opet otpušta u obliku sulfata, a dio toga sulfata ulazi u mikroorganizme. Također postoji i niz prirodnih izvora koji sumpor otpuštaju izravno u atmosferu kao što su vulkanske erupcije, raspad organske tvari u močvarama i vodama stajaćicama te ispravljanje vode.



Slika 1. Kruženje sumpora u prirodi

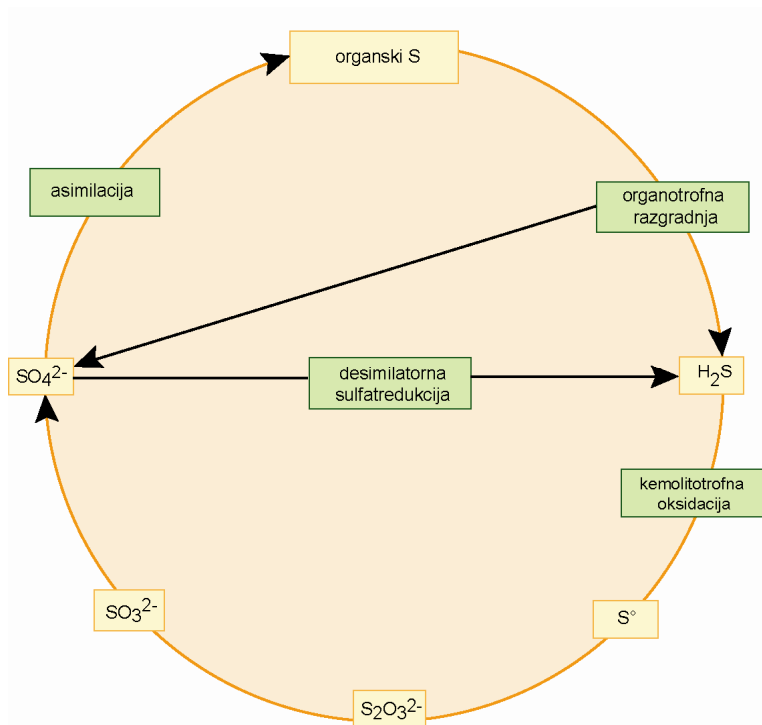
Sumpor se s vremenom istaloži natrag na zemljinu površinu ili se vraća na nju oborinama. Kontinuirani gubitak sumpora odvija se preko odvodnje u rijeke i jezera, te s vremenom u mora odnosno oceane. Sumpor također ulazi u oceane putem zemljine atmosfere, tj. oborina. Unutar oceana sumpor kruži kroz morske zajednice i ekosisteme preko njihovih hranidbenih lanaca. Dio tog sumpora se vraća u atmosferu, a dio se gubi u dubokomorskim sedimentima, povezujući se sa željezom stvarajući željezne sulfide odgovorne za tamnu boju većine morskih sedimenata.

Od početaka industrijske revolucije ljudske djelatnosti doprinjele su količini sumpora koji se otpušta u atmosferu, posebice izgaranjem fosilnih goriva i obradom metala. Trećina svog sumpora koji dopire do atmosfere, uključujući 90% sumpornog dioksida, potječe od ljudskih aktivnosti. Otpušteni sumporni spojevi, zajedno sa dušikovim spojevima, reagiraju s ostalim kemikalijama u atmosferi te stvaraju male čestice sulfatnih soli koje se vraćaju na Zemlju u obliku kiselih kiša, uzrokujući širok spektar šteta na prirodnim okolišima. No, isto tako sumpor djeluje i kao regulator globalne klime. Sumporni dioksid i sumporni aerosoli apsorbiraju ultraljubičasto zračenje stvarajući nakupine oblaka koji hlade gradove, no potiču globalno zagrijavanje povećavajući količinu dugovalnog zračenja kroz efekt staklenika.

1.3. Sudjelovanje mikroorganizama u procesima kruženja sumpora u prirodi

Glavni rezervoar sumpora u prirodi je organska frakcija tla (humus), u kojoj se sumpor nalazi u obliku estera sulfata i aminokiselina. Nakon smrti organizama, kemoorganoheterotrofni mikroorganizmi (saprofiti) mineraliziraju organske spojeve sumpora (Slika 2). Kroz anaerobnu razgradnju aminokiselina koje sadrže sumpor nastaju sulfatni ioni (SO_4^{2-}), a također i otrovni plin sumporovodik (H_2S). Oksidacijom sumporovodika bakterijama roda *Thiobacillus* preko elementarnog sumpora (S^0) i tiosulfata ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$) nastaju sulfatni ioni (SO_4^{2-}) koji su jedini oblik sumpora pogodan za asimilaciju u biljne organizme. Stoga je redukcija sulfata kako bi se iskoristio u biosintezi aminokiselina i proteina primjer asimilatorne reakcije. U anaerobnim uvjetima sulfat je terminalni akceptor elektrona u procesu sulfatnog disanja obligatnih anaerobnih bakterija roda *Desulfovibrio* i *Desulfotomaculum*, prilikom čega se reducira do sumporovodika. Ovaj način korištenja sulfata kao vanjskog akceptora elektrona u procesu stvaranja sulfida, koji se nakuplja u

okolišu, primjer je disimilatornog redukcijskog procesa i anaerobne respiracije. Sposobnost dobivanja i korištenja energije putem oksidacije tiosulfata kod sulfat-producirajućih bakterija upravljana je povezanošću s respiratornim lancem na razini citokroma c (Sorokin 1994).



Slika 2. Uloga mikroorganizama u ciklusu kruženja sumpora u prirodi

U biogeokemijskim ciklusima sumpora H₂S se stvara razgradnjom proteina ili redukcijom sulfata, a u svakom slučaju njegova nazočnost u vodi ukazuje na anaerobiju i toksičnost sredine zvane „sulfuretum“ za sve vodene organizme osim anaerobnih, fotosintetskih sumpornih bakterija.

Vrlo malo sumpora prisutno je u živim organizmima, no u primjerice kopnenim močvarama, gdje dolazi do nakupljanja organske tvari u anaerobnim uvjetima, prisutne su značajnije količine sumpora. Bakterije predstavljaju većinu biomase i obavljaju većinu kemijskih procesa u takvim sedimentima (Nealson 1997). Ekologija okoliša bogatih sumporom još je

slabo razjašnjena zbog kompleksne povezanosti anaeroba i aeroba te njihovog mutualističkog odnosa. Kompletan ciklus sumpora, odnosno reakcije oksidacije i redukcije, može se odvijati u makrookolišima kao što su kanalizacije i zagađene luke ili unutar mikrookoliša kao što su biofilmovi (Little i sur. 2000). Bitno je primijetiti kako se redukcijski dio ciklusa kruženja sumpora, primjerice redukcija sulfata, odvija samo u biološkim uvjetima (Okabe i sur. 2004). Količine koje ulaze u kruženje sumpora iz takvih izvora su male, no prepoznatljivi miris po pokvarenim jajima prevladava u zraku oko takvih lokacija. Izrazito neugodan, pokvareni miris sumporovodika uzrokovan je sulfid-producirajućim bakterijama, ponajviše vrstom *Shewanella putrefaciens* (Skjerdal i sur. 2004). Povećane koncentracije atmosferskog sumpora izravna su posljedica ljudskih djelatnosti. Većina tih spojeva kratkog su vijeka te se ispiru kiselim kišama, što utječe na ravnotežu ciklusa kruženja sumpora (CliffsNotes.com).

1.4. Određivanje prisutnosti sumporovodika na hranjivim podlogama

Sumporovodik se uglavnom otkriva na hranjivim podlogama opažanjem zacrnjenja koja nastaju na podlozi u prisustvu soli određenih metala (željezo, olovo, bizmut), a crna boja tih područja posljedica je postojanja sulfida u tim metalima. Standardne hranjive podloge za brojanje bakterija koje proizvode sumporovodik sadrže tiosulfate i cistein, pa se bakterije, koje su sposobne stvarati sumporovodik iz bilo kojeg od dva izvora sumpora, pojavljuju kao crne kolonije. No neke bakterije ne proizvode sumporovodik iz tiosulfata, nego samo iz sumpora koji potječe iz aminokiselina koje ga sadrže (Gram i sur. 1987). S ekološkog gledišta bitno je razlikovati fiziološku grupu proteolitičkih bakterija koje proizvode sumporovodik (PSPB) od ostalih bakterija koje proizvode sumporovodik iz sulfata ili tiosulfata.

Važno je primijetiti kako ne postoji općenito prihvaćen medij odnosno hranjiva podloga za prebrojavanje poraslih kolonija PSPB-a. Temeljem prijašnjih istraživanja (Stilinović i Futac 1990) ovo istraživanje polazi od činjenice da će se anaerobno okruženje postići u sredini svih bakterijskih kolonija, rastući na površini hranjive podloge tijekom inkubacije. U sredini kolonije koja proizvodi sumporovodik, nakon potrebnog vremena inkubacije na hranjivoj podlozi bogatoj aminokiselinama koje sadrže sumpor, ubrzo će doći do stvaranja crnog područja u sredini kolonije.



Slika 3. U sredini crnih kolonija dolazi do stvaranja sumporovodika

1.5. Bakterijski rodovi uključeni u stvaranje sumporovodika (H₂S) iz proteina

Fiziološka grupa proizvođača sumporovodika (H₂S) iz proteina (aminokiselina) obuhvaća različite rodove bakterija, kao što su *Aeromonas*, *Brevibacterium*, *Clostridium*, *Flavobacterium*, *Proteus*, *Sarcina*. U sljedećim odlomcima ukratko su navedene osnovne fiziološke značajke navedenih bakterijskih rodova (prema Bergeyevom priručniku za bakteriološku determinaciju; Holt i sur. 1994).

Brevibacterium – nepravilni štapići, 0,6-1,2 x 1,5-6 µm. Dolaze pojedinačno ili u parovima, često pod kutem koji im daje izgled slova V. U starijim kulturama štapići se segmentiraju u male koke. Gram pozitivne, no lako se obezboje. Nepokretne, ne stvaraju spore. Striktni aerobi. Kolonije mogu biti žuto-narančaste ili ljubičaste boje. Kemoorganotrofi sa respiratornim metabolizmom. Optimalna temperatura rasta u rasponu 20-35 °C. Široko rasprostranjeni u mliječnim proizvodima, a nađeni su i na ljudskoj koži.

Clostridium – štapićaste stanice, 0,3-2,0 x 1,5-20,0 µm. Nalazimo ih u parovima ili kratkim lancima sa zaobljenim ili zašiljnim krajevima. Obično pleomorfne (više oblika tokom života), Gram pozitivne, pokretljive pomoću peritrihnih bičeva. Stvaraju ovalne ili kružne endospore koje rastegnu stanicu. Većina vrsta je kemoorganotrofna, neke kemoautotrofne ili kemolitotrofne. Ne obavljaju disimilatornu redukciju sulfata. Obligatni anaerobi, ako rastu u prisutnosti zraka tada je rast oskudan te je sporulacija onemogućena. Metabolički iznimno raznovrsne, sa temperaturnim rasponom 10-65 °C. Široko rasprostranjene u okolišu. Mnoge vrste proizvode snažne egzotoksine, a neke su i patogene za životinje zbog svog potencijala za infekciju rana te toksičnog karaktera.

Sarcina – stanice okrugle ili gotovo okrugle, 1,8-3 µm u promjeru. Dolaze u nakupinama od osam ili više jedinki. Neke stanice se pojavljuju same, no dolaze i u parovima ili tetradama. Gram pozitivne, nepokretne, anaerobne. Kemoorganotrofne, za rast potreban medij bogat hranjivim tvarima i ugljikohidratima. Metabolizam fermentativan sa ugljikohidratima kao supstratima, a kao proizvodi toga metabolizma stvaraju se octena kiselina, vodik, ugljikov dioksid i drugi spojevi. Za rast optimalna temperatura 30-37 °C. Široko rasprostranjena u prirodi, obično izolirana iz probavnog trakta sisavaca te sjemenki žitarica.

Aeromonas – ravni štapići sa zaobljenim krajevima, no pojavljuju se i oblici okruglog oblika, 0,3-1,0 µm u promjeru te 1,0-3,5 µm duljine. Pojavljuju se pojedinačno, u parovima ili kratkim lancima. Gram negativni. Obično pokretni pomoću jednog vršnog biča. Fakultativni anaerobi. Kemoorganotrofni, posjedujući respiratorni i fermentativni oblik metabolizma. Optimalni rast pri temperaturi 22-28 °C, većina vrsta raste i na 37 °C. Reduciraju nitrata. Nalazimo ih čistim i otpadnim vodama. Neke vrste su patogene za žabe, ribe i ljude. Od ljudskih zaraza najčešći su proljev i bakteremija.

Proteus – ravni štapići, 0,4-0,8 µm u promjeru x 1-3 µm dužine. Gram negativni. Pokretni pomoću peritrihnih bičeva. Većinu vrsta nalazimo u nakupinama sa periodičnim ciklusima migracija, pri čemu se stvaraju kružne zone u jednom sloju preko vlažnih površina hranjivih medija stvrdnutih agarom ili želatinom. Kemoorganotrofni, fakultativni anaerobi. Posjeduju respiratorni i fermentativni oblik metabolizma. Optimalan rast pri temperaturi od 37 °C. Rastu na kalijevom cijanidu (KCN). Obično se stvara sumporovodik (H₂S). Reduciraju nitrata. Pojavljuju se u crijevima ljudi te mnogih životinja, a pojavljuju se i u gnojivu, tlu i zagađenoj

vodi. Patogeni kod ljudi, uzrokujući urinarne infekcije. Također i sekundarni patogeni, česti kod opečenih pacijenata gdje uzrokuju gnojne rane.

Flavobacterium – štapići paralelnih strana sa zaobljenim krajevima, veličine 0,5 x 1,0-4,0 µm. Endospore se ne stvaraju. Gram-negativni. Nepokretni. Aerobni, sa strogim respiratornim oblikom metabolizma. Okolišni uzorci optimalno rastu na temperaturi od 37 °C. Kolonije porasle na čvrstoj podlozi obično pigmentirane (žuto do naračasto), no pojavljuju se i nepigmentirane. Kolonije prozirne (ponekad neprozirne), kružne (promjera 1-2 mm), konveksne, glatke i sjajne sa cjelovitim rubovima. Kemoorganotrofni. Široko rasprostranjene u tlu i vodama, nađene i kod sirovog mesa, mlijeka i ostale hrane te također u bolnicama i kod ljudskog kliničkog otpada.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Okolišni uzorci

Ukupno je skupljeno 26 različitih okolišnih uzoraka s područja grada Zagreba. Skupljeno je četrnaest uzoraka vode iz prirodnih i umjetnih jezera, potoka i rijeka te dvanaest uzoraka sedimenta koji su odgovarali lokacijama uzoraka vode. Tijekom uzorkovanja vršena su mjerenja pH vrijednosti i koncentracija otopljenog kisika u vodi te intersticijalne vode u sedimentu pomoću WTW 330 pH metra i WTW Oxi 330i oksimentra.

2.2. Podloga

Testirana je podloga imena pepton-cistein-amonij-željezov citratni agar (PCA) za izolaciju i brojenje PSPB-a.

Sastav PCA podloge:

Bakteriološki pepton (Biolife)	5,0 g
Peptonska proteoza (Biolife)	5,0 g
L-cistein (Fluka)	0,25 g
NaCl (Kemika)	5,0 g
Amonij-željezov(III) citrat (Sigma-Aldrich)	1,0 g
K ₂ HPO ₄ (Kemika)	0,3 g
Agar (Biolife)	15,0 g
Destilirana voda	1000 mL
pH	7,4 ± 0,2

Sastav SIM podloge:

Pepton iz kaseina	20,0 g
Pepton iz mesa	6,6 g
Amonij-željezov(III) citrat	0,2 g
Natrijev tiosulfat	0,2 g
Agar	15,0 g
Destilirana voda	1000 mL
pH	7,3 ± 0,2

SIM podloga (Merck) korištena je kao kontrolna podloga za usporedbu rezultata. pH vrijednost podloga namještala se s 1 mol/L HCL ili 1 mol/L NaOH. Podloge su autoklavrane (121 °C/20 min) te izlijevane na Petrijeve ploče.

2.3. Eksperimentalne metode

Svježi uzorci analizirani su tri sata nakon sakupljanja. Napravljena su serijska razrjeđenja (10^{-1} do 10^{-4}) jednog mililitra vode ili jednog grama sedimenta. Razrjeđenja (0,1 mL) su nacijepljena na oba tipa hranjivih podloga (PCA i SIM) metodom širenja razmaza (APHA 1995) u triplicatu. Ovi triplicati odmah su inkubirani na $26 \pm 0,1$ °C kako bi se dobio broj aerobno poraslih kolonija PSPB-a. Sljedeći triplikat PCA i SIM podloga inkubiran je anaerobno ($26 \pm 0,1$ °C) u Anaerocultu A (Merck) kako bi se dobio broj anaerobno poraslih kolonija PSPB-a. Broj poraslih crnih kolonija nakon tri dana inkubacije nije se povećao inkubacijom do pet dana. Stoga je prebrojani broj svih nastalih kolonija nakon tri dana od početka inkubacije uzet kao konačan te se izračunao broj poraslih kolonija PSPB-a

Sve vidljivo različite porasle kolonije PSPB-a na PCA i SIM podlogama izolirane su na hranjivom agaru (Biolife). Čiste kulture PSPB-a obojane su Gramovom metodom te pregledane pod svjetlosnim mikroskopom (Olympus, BX51) pod imerzionim objektivom na povećanju od 1000 puta. Iste kulture su identificirane korištenjem API 20E pribora ili po

biokemijskim karakteristikama prema Bergeyevom priručniku za bakteriološku determinaciju (Holt i sur. 1994).

2.4. Analiza podataka

Statističke analize napravljene su koristeći kompjutorski program Statistica (StatSoft Inc. 2005). Rezultati su postavljeni kao omjer broja poraslih kolonija PSPB-a na PCA podlozi prema broju poraslih kolonija PSPB-a na SIM podlozi. Podaci ovog tipa su neovisni odnosno ne mogu se usporediti s nekim prijašnjim rezultatima te je stoga proveden i klasičan t-Studentov test. Početna hipoteza testirana ovom analizom bila je da PCA i SIM podloge nisu pokazivale razlike u konačnom broju poraslih kolonija. Rezultati su se smatrali važećima na razini od 5% ($p=0,05$). Korelacija među varijablama procijenjena je koristeći Pearsonovu linearnu korelaciju.

3. REZULTATI

3.1. Porasle bakterijske kolonije (CFU) na testiranim podlogama

Nakon naciepljivanja na PCA podlogu prva zacrnjenja pojavila su se nakon 24 sata inkubacije te se njihov broj povećavao inkubacijom do tri dana, no daljnom inkubacijom do pet dana broj crnih kolonija nije rastao. SIM podloga pokazivala je isti trend razvoja crnih kolonija. Stoga su se kao konačni rezultati na PCA i SIM podlogama uzimali oni dobiveni nakon perioda inkubacije od tri dana. U svim slučajevima na PCA i SIM podlogama pored PSPB kolonija (crne kolonije) uočene su i prateće heterotrofne kolonije koje nisu pripadale PSPB tipu kolonija (želatinozne kolonije, Slika 4). Ove bakterijske kolonije činile su otprilike 98% ukupnog broja kolonija, no nisu remetile prepoznavanje i prebrojavanje kolonija PSPB tipa na oba tipa podloga ($r=0,58$, $p<0,05$). Broj poraslih kolonija PSPB-a značajno je pozitivno odgovarao broju poraslih kolonija na oba tipa podloga ($r=0,60$, $p<0,05$).



Slika 4. Porasle crne PSPB kolonije nakon inkubacije u trajanju od tri dana.

Rezultati procjene PCA podloge u usporedbi s kontrolnom SIM podlogom za izolaciju PSPB-a iz različitih okolišnih uzoraka prikazani su u Tablicama 1-4 te Slikama 5-8. Sveukupno gledajući veći broj PSPB kolonija porastao je na PCA nego na SIM hranjivim podlogama. U uzorcima vode (Tablica 1) broj poraslih kolonija PSPB-a u aerobnim uvjetima bio je u prosjeku 1,5 puta veći ($p > 0,05$) kada su uzgajane na PCA podlogama (250/mL) nego na SIM podlogama (175/mL). Kod uzoraka vode (Tablica 2) gdje su kolonije PSPB-a uzgajane u aneobnim uvjetima broj kolonija bio je 1,1 puta veći ($p > 0,05$) kada su se uzgajale na PCA podlogama (139/mL) nego na SIM podlogama (122/mL). Kod uzoraka sedimenta (Tablica 3) broj poraslih kolonija PSPB-a u aerobnim uvjetima bio je 2,9 puta veći ($p < 0,05$) kada su uzgajane na PCA podlogama (10908/g) nego na SIM podlogama (3768/g). Kod uzoraka sedimenta (Tablica 4) uzgajanih u anaerobnim uvjetima primijećeno je kako su prosječne vrijednosti poraslih kolonija PSPB-a 3,6 puta veće ($p < 0,05$) kada su se uzgajale na PCA podlogama (36600/g) nego na SIM podlogama (10198/g).

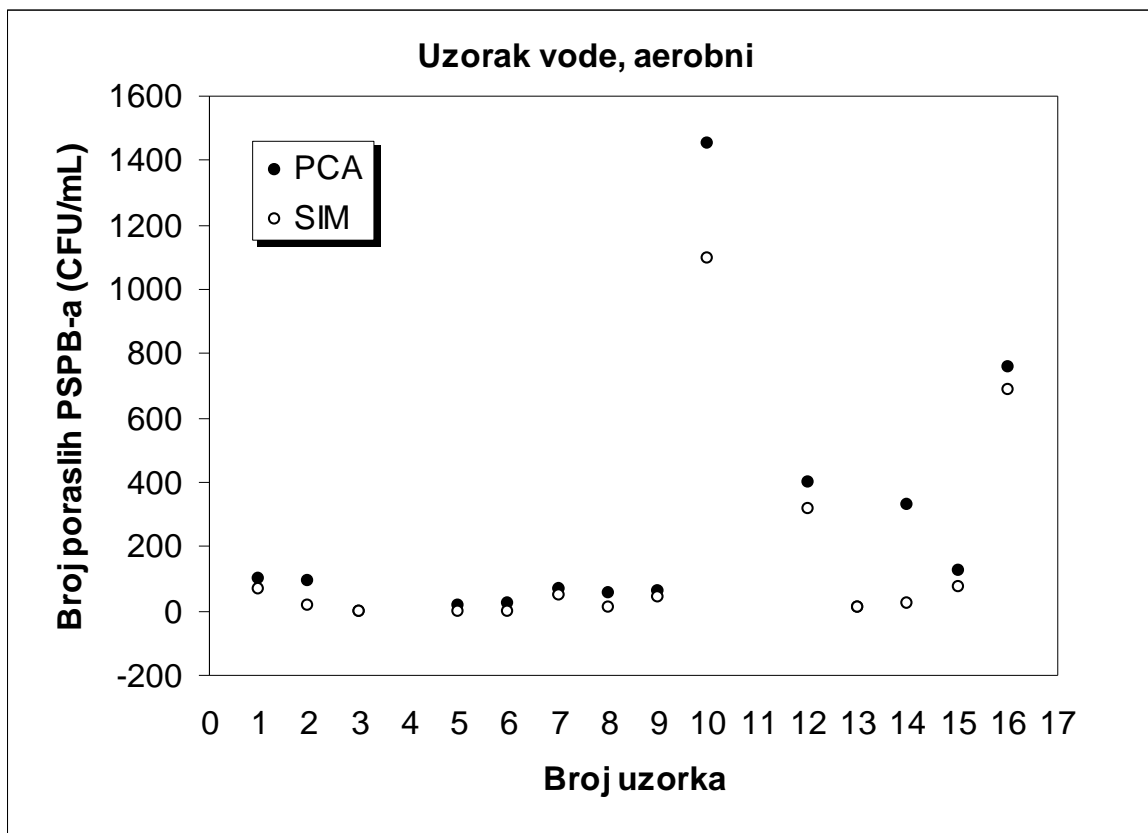
U uzorcima vode broj PSPB-a koji su uzgojeni aerobno bio je veći nego onih uzgojenih anaerobno (1,8 i 1,4 puta veći na PCA nego na SIM podlozi, $p > 0,05$). U uzorcima sedimenta broj anaerobno uzgojenih PSPB-a bio je veći nego onaj uzgojenih aerobnim putem (3,4 i 2,7 puta viši na PCA podlozi nego na SIM podlozi, $p < 0,05$). Ovaj afinitet populacija PSPB-a prema rastu u aerobnim i anaerobnim uvjetima objašnjava se njihovom sposobnošću adaptacije na okolišne uvjete. Točnije, koncentracija otopljenog kisika bila je viša u uzorcima vode (6,9-8,7 mg O₂/L), dok su uzorci sedimenta bili anoksični (0,4-0,2 mg O₂/L). Prosječna pH vrijednost uzoraka sedimenata ($7,75 \pm 0,33$) bila je značajno niža ($p < 0,05$) od odgovarajućih uzoraka vode ($8,31 \pm 0,32$).

Kada sažmemo sve rezultate, broj poraslih kolonija PSPB-a bio je značajnije veći ($p < 0,05$) u slučajevima kada se izolirao na PCA nego na SIM hranjivu podlogu. Prosječne vrijednosti broja poraslih kolonija PSPB-a bile su 3,4 puta veće kada su se kolonije uzgajale na PCA podlozi ($11 \pm 24 \times 10^3$) nego na SIM podlozi ($3 \pm 8 \times 10^3$). Međusobni odnos između PCA i SIM podloge bio je značajno pozitivan ($r=0,72$, $p < 0,05$), što ukazuje na to da povišeni broj poraslih kolonija nije posljedica lažnog pozitivnog rezultata. Koeficijent varijacije rezultata PCA podloga bio je prosječno 8,0%, što nije više nego što je za SIM podlogu (10,6%) i zadovoljavajuće je za oblik biološke metode kao što je određivanje poraslih bakterijskih kolonija.

Tablica 1. Broj poraslih kolonija (CFU/mL) aerobno uzgojenih proteolitičkih sulfid-producirajućih bakterija izoliranih iz uzoraka vode na PCA i SIM podlogama.

SD = standardna devijacija, KV = koeficijent varijacije (%).

	PCA			SIM		
Uzorak br.	Srednja vrijednost	SD	KV	Srednja vrijednost	SD	KV
1	100	10	10,0	70	10	14,3
2	95	5	5,3	18	3	14,2
3	0	0	0	0	0	0
5	18	2	11,1	0	0	0
6	25	5	20,0	0	0	0
7	70	10	14,3	50	10	20,0
8	55	5	9,1	10	0	0
9	63	8	12,0	45	5	11,1
10	1453	118	8,1	1098	13	1,1
12	400	20	5,0	320	30	9,4
13	10	0	0	8	3	33,3
14	330	40	12,1	25	5	20,0
15	125	15	12,0	75	5	6,7
16	755	55	7,3	690	80	11,6

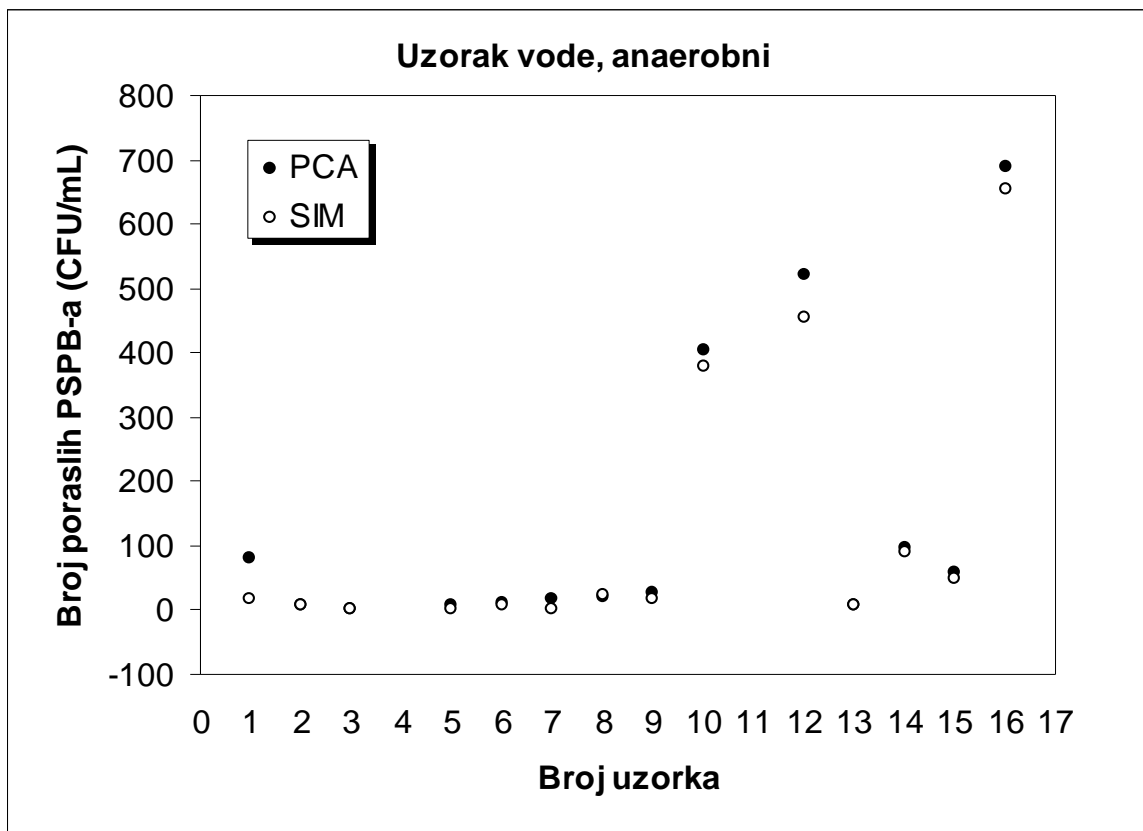


Slika 5. Grafički prikaz broja poraslih kolonija (CFU/mL) aerobno uzgojenih proteolitičkih sulfid-producirajućih bakterija izoliranih iz uzoraka vode na PCA i SIM podlogama.

Tablica 2. Broj poraslih kolonija (CFU/mL) anaerobno uzgojenih proteolitičkih sulfid-producirajućih bakterija izoliranih iz uzoraka vode na PCA i SIM podlogama.

SD = standardna devijacija, KV = koeficijent varijacije (%).

	PCA			SIM		
Uzorak br.	Srednja vrijednost	SD	KV	Srednja vrijednost	SD	KV
1	80	10	12,5	17	3	17,6
2	9	2	17,6	8	2	25,0
3	0	0	0	0	0	0
5	9	1	11,1	0	0	0
6	10	0	0	9	2	17,6
7	18	3	14,3	0	0	0
8	22	2	9,1	24	6	25,0
9	26	4	15,4	16	4	25,0
10	405	25	6,2	380	20	5,3
12	520	30	5,8	455	55	12,1
13	9	1	11,1	9	2	17,6
14	95	15	15,8	90	20	22,2
15	59	12	19,7	49	11	22,4
16	690	20	2,9	655	5	0,8

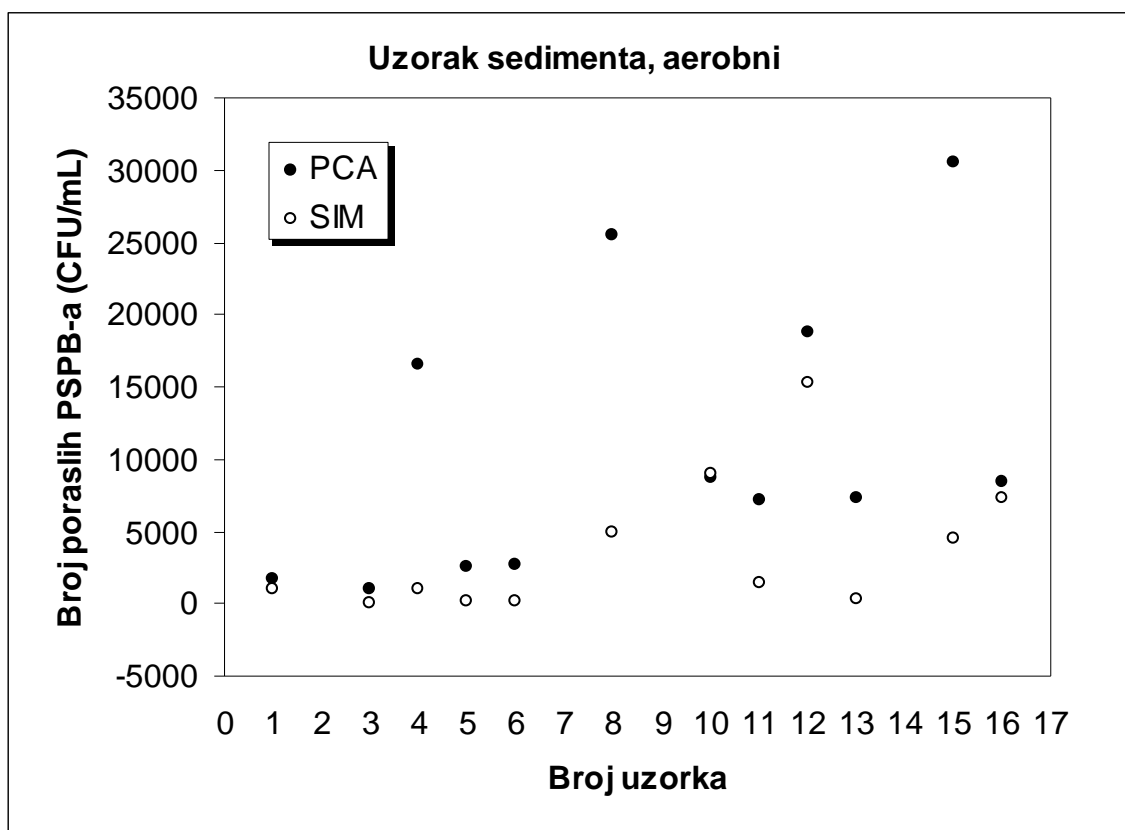


Slika 6. Grafički prikaz broja poraslih kolonija (CFU/mL) anaerobno uzgojenih proteolitičkih sulfid-producirajućih bakterija izoliranih iz uzoraka vode na PCA i SIM podlogama.

Tablica 3. Broj poraslih kolonija (CFU/g) aerobno uzgojenih proteolitičkih sulfid-producirajućih bakterija izoliranih iz uzoraka sedimenata na PCA i SIM podlogama.

SD = standardna devijacija, KV = koeficijent varijacije (%).

	PCA			SIM		
Uzorak br.	Srednja vrijednost	SD	KV	Srednja vrijednost	SD	KV
1	1750	50	2,9	1015	185	18,2
3	1020	180	17,6	95	5	5,3
4	16600	1000	6,0	1000	100	10,0
5	2550	250	9,8	160	40	25,0
6	2650	150	5,7	170	30	17,6
8	25425	575	2,3	4975	525	10,6
10	8700	400	4,6	8950	50	0,6
11	7150	50	0,7	1500	300	20,0
12	18800	200	1,1	15250	250	1,6
13	7300	200	2,7	355	45	12,7
15	30500	2700	8,9	4450	150	3,4
16	8450	250	3,0	7300	100	1,4

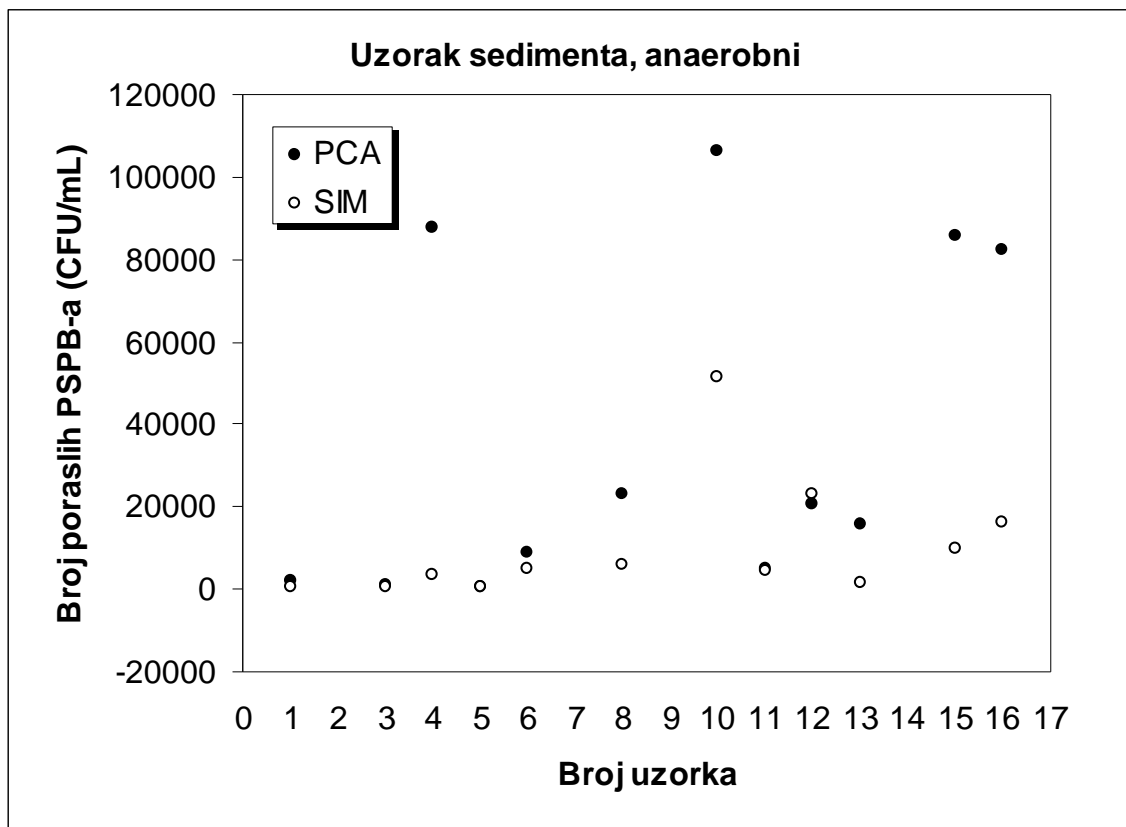


Slika 7. Grafički prikaz broja poraslih kolonija (CFU/g) aerobno uzgojenih proteolitičkih sulfid-producirajućih bakterija izoliranih iz uzoraka sedimenata na PCA i SIM podlogama.

Tablica 4. Broj poraslih kolonija (CFU/g) anaerobno uzgojenih proteolitičkih sulfid-producirajućih bakterija izoliranih iz uzoraka sedimenata na PCA i SIM podlogama.

SD = standardna devijacija, KV = koeficijent varijacije (%).

Uzorak br.	PCA			SIM		
	Srednja vrijednost	SD	KV	Srednja vrijednost	SD	KV
1	1950	350	17,9	650	50	7,7
3	1050	50	4,8	510	10	2,0
4	87500	1100	1,3	3600	600	16,7
5	550	50	9,1	405	5	1,2
6	9000	1000	11,1	4925	175	3,6
8	23300	3500	15,0	6025	225	3,7
10	106250	10750	10,1	51600	400	0,8
11	5200	100	1,9	4500	300	6,7
12	20600	1800	8,7	22900	3100	13,5
13	15800	400	2,5	1450	250	17,2
15	85500	2500	2,9	9800	1500	15,3
16	82500	2500	3,0	16000	1300	8,1



Slika 8. Grafički prikaz broja poraslih kolonija (CFU/g) anaerobno uzgojenih proteolitičkih sulfid-producirajućih bakterija izoliranih iz uzoraka sedimenata na PCA i SIM podlogama.

3.2. Mikroskopska i biokemijska analiza izoliranih PSPB-a

Mikroskopska analiza izoliranih kolonija aerobno poraslih PSPB-a potvrdila je da se u svim slučajevima radi o Gram negativnim nesporogenim štapićima. Zajednička karakteristika izoliranih kultura bila je želatinozna aktivnost te fakultativni anaerobni metabolizam. Izolirani uzorci pripadali su većinom rodovima *Aeromonas* i *Shewanella* te u nekim slučajevima rodovima *Erwinia* i *Citrobacter*. Bakterije roda *Shewanella* spadaju u vodene mikroorganizme svjetske raširenosti. Njihovo glavno obilježje jest njihova velika varijabilnost respiratornih sposobnosti (Hau i Gralnick 2007). Na anaerobno uzgojenim kulturama pored spomenutih fakultativnih anaeroba također su izolirani i obligatni anaerobi iz roda *Clostridium*. Između bakterijskih rodova izoliranih na PCA i SIM podlogama nije bilo razlike.

Ukratko, karakteristike bakterijskih rodova izoliranih iz obrađenih uzoraka su sljedeće (prema Bergeyevom priručniku za bakteriološku determinaciju; Holt i sur. 1994):

Aeromonas – ravni štapići sa zaobljenim krajevima, no pojavljuju se i oblici okruglog oblika, 0,3-1,0 μm u promjeru te 1,0-3,5 μm duljine. Pojavljuju se pojedinačno, u parovima ili kratkim lancima. Gram negativni. Obično pokretni pomoću jednog vršnog biča. Fakultativni anaerobi. Kemoorganotrofni, posjedujući respiratorni i fermentativni oblik metabolizma. Optimalni rast pri temperaturi 22-28 °C, većina vrsta raste i na 37 °C. Reduciraju nitrate. Nalazimo ih čistim i otpadnim vodama. Neke vrste su patogene za žabe, ribe i ljude. Od ljudskih zaraza najčešći su proljev i bakteremija.

Citrobacter – ravni štapići, veličine otprilike 1 μm u promjeru te 2-6 μm u dužinu. Gram negativni. Većina vrsta pokretna. Kemoorganotrofni, fakultativni anaerobi. Optimalna temperatura rasta kod 37 °C. Reduciraju nitrate. Izoliraju se iz ljudskih kliničkih uzoraka, u više od 50% uzoraka iz respiratornog sustava. Rijetko se pojavljuje kao oportunistički patogen.

Clostridium – štapićaste stanice, 0,3-2,0 x 1,5-20,0 μm . Nalazimo ih u parovima ili kratkim lancima sa zaobljenim ili zašiljnim krajevima. Obično pleomorfne (više oblika tokom života), Gram pozitivne, pokretljive pomoću peritrihnih bičeva. Stvaraju ovalne ili kružne endospore koje rastegnu stanicu. Većina vrsta je kemoorganotrofna, neke kemoautotrofne ili kemolitotrofne. Ne obavljaju disimilatornu redukciju sulfata. Obligatni anaerobi, ako rastu u

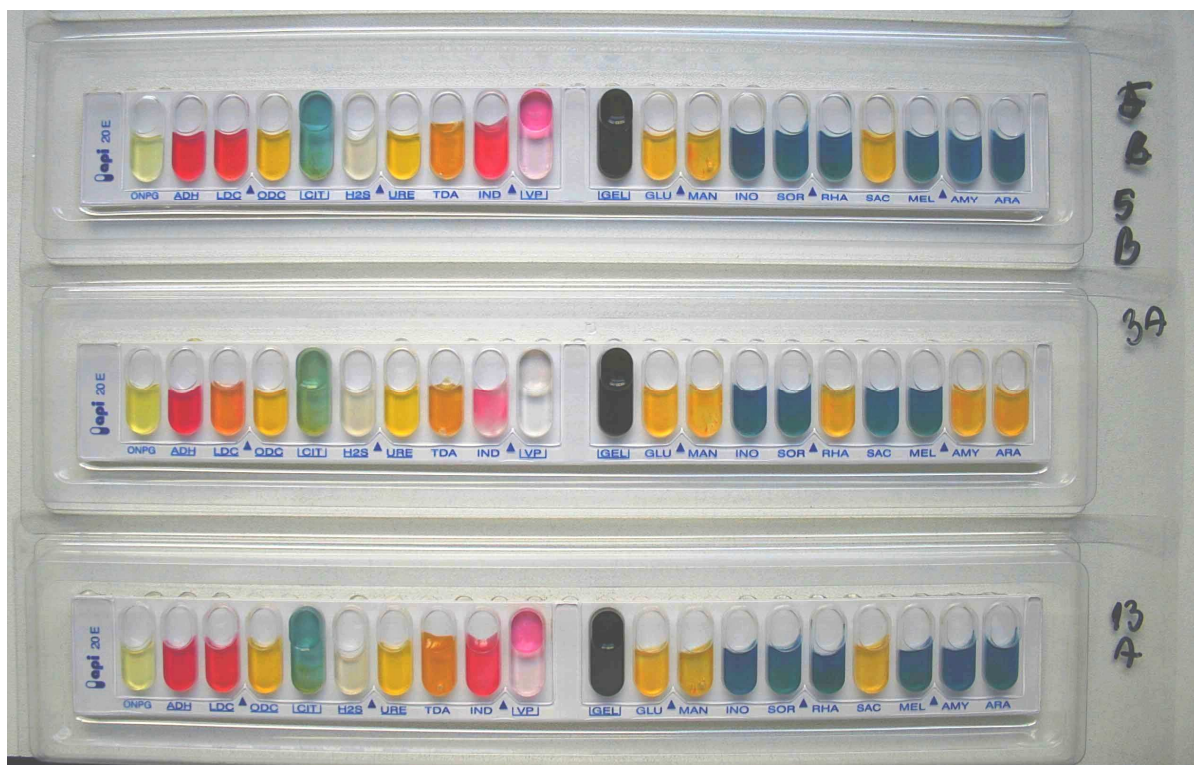
prisutnosti zraka tada je rast oskudan te je sporulacija onemogućena. Metabolički iznimno raznovrsne, sa temperaturnim rasponom 10-65 °C. Široko rasprostranjene u okolišu. Mnoge vrste proizvode snažne egzotoksine, a neke su i patogene za životinje zbog svog potencijala za infekciju rana te toksičnog karaktera.

Erwinia – ravni štapići, veličine 0,5-1,0 x 1-3 µm. Pojavljuju se pojedinačno, u parovima, a katkad u kratkim lancima. Gram negativne. Pokreću se pomoću peritrihnih bičeva (osim *E. stewartii*). Fakultativni anaerobi. Kemoorganotrofni, posjeduju i respiratorni i fermentativni oblik metabolizma. Optimalna temperatura rasta pri rasponu od 27-30 °C. Mnoge vrste ne reduciraju dušikove spojeve. Povezane sa biljkama kao patogeni, saprofiti te izgrađuju epifitsku floru. Vrlo rijetko izolirani iz ljudi.

Shewanella – ravni, lagano zakrivljeni štapići, veličine 0,5-1,0 x 1,5-5,0 µm. Gram negativne. Pokretljive pomoću jednog ili više polarnih bičeva. Fakultativno anaerobni. Nađeni u mnogim okolišima kao što su slatkovodna jezera, morski sedimenti, podzemne formacije i na različitim dubinama stratificiranih vodenih sustava. Posjeduju iznenađujuću sposobnost korištenja širokog spektra spojeva koji služe kao akceptori elektrona u procesima disanja. Neki od njih su kisik, željezo, mangan, uran, krom, vanadij, nitrat, nitrit te fumarat. Ova raznovrsnost respiratornih mogućnosti čini bakterije roda *Shewanella* posebno važnim objektom u razvoju biotehnoloških metoda, ali i procesima bioremedijacije okoliša zagađenih metalima i radioaktivnim otpadom (Doe Joint Genome Institute, *Shewanella* genus).

3.3. Determinacija bakterijskih rodova pomoću API 20E kompleta

Ukoliko je mikrob Gram negativna štapićasta bakterija, jedan od najčešće korištenih dijagnostičkih testova jest API 20E pločica. Ona se sastoji od dvadeset zasebnih, minijaturnih testnih pretinaca, od kojih svaki sadrži različiti reagens prema kojem se određuju metaboličke sposobnosti bakterije te u konačnici njen rod i vrsta. Nakon inkubacije svaki pretinac se analizira prema promjeni boje, što upućuje na prisutnost metaboličke reakcije. Rezultati dvadeset reakcija pretvaraju se u sedmeroznamenkastu šifru čije se značenje provjerava u bakterijskom priručniku koji sadrži imena bakterijskih vrsta povezanih s dobivenim sedmeroznamenkastim brojem.



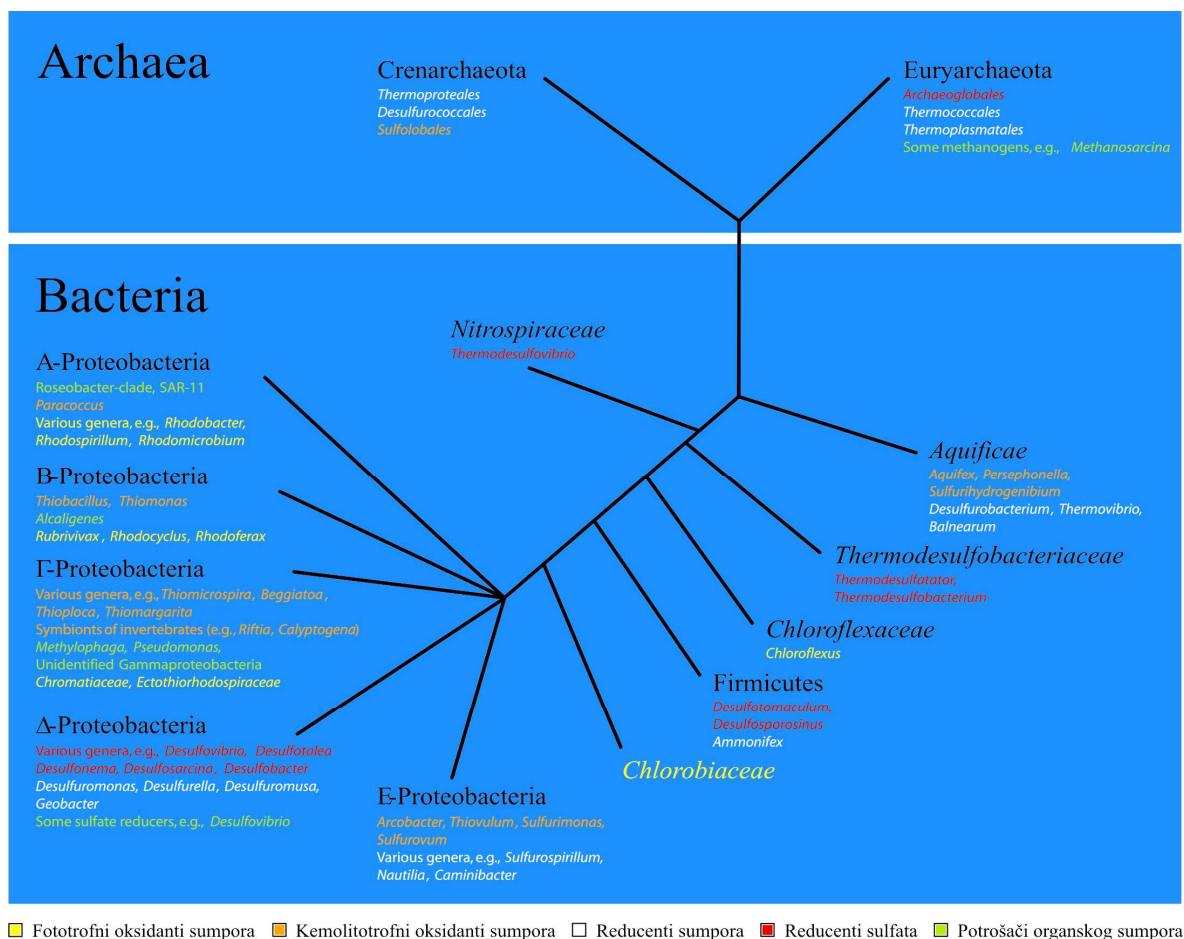
Slika 9. API 20E; biokemijska serija te kasnije determiniranje rodova bakterija pomoću dobivenih rezultata.

4. RASPRAVA

Sumporovodik (H_2S) predstavlja središnju kariku u ciklusu sumpora, biogeokemijskom ciklusu kruženja sumpora na Zemlji. Sumpor-reducirajuće i sulfat-reducirajuće bakterije dobivaju energiju oksidacijom vodika ili organskih molekula u odsustvu kisika tako što reduciraju sumpor ili sulfate do sumporovodika. Druge, proteolitičke bakterije oslobađaju sumporovodik razgradnjom aminokiselina koje sadrže sumpor. Sumporovodik (H_2S), toksičan je za životinje i biljke te njegovo stvaranje u okolišu privlači veliku pozornost. Do nakupljanja sumporovodika u tlu i sedimentu može doći ako postoji izvor (geotermalni, prirodni izvor plinovitog H_2S -a) ili ako se odvija biološka anaerobna degradacija, kao što je slučaj u močvarama ili anaerobnim nakupinama raspadajućeg biljnog i životinjskog materijala.

Prisustvo sumporovodika u uzorcima uzetima iz okoliša može biti posljedica anaerobnog raspadanja organske tvari, posredstvom proteolitičkih bakterija, koja sadrži sumpor u obliku aminokiselina u čijem se sastavu on nalazi kao što su metionin, cistein i cistin (asimilacijska redukcija sulfata) ili potječe od redukcije sulfata ili tiosulfata (disimilacijska redukcija sulfata) (Bitton 2005). Na uobičajenom tipu podloge za detekciju bakterija koje proizvode sumporovodik nije moguće razlikovati potječe li sumporovodik od degradacije proteina ili redukcije tiosulfata. Cistein ima tu prednost koja mu omogućuje da ga oslobađanjem sumporovodika iskoriste određene bakterije koje ne reduciraju sulfat ili tiosulfat.

Stoga se u ovom istraživanju pristupilo izradi podloge kod koje su proteini jedini izvor sumpora. Razvoj ovoga novog tipa hranjive podloge od velikog je značaja budući da omogućava rast proteolitičkih sulfid-producirajućih bakterija. Također je značajno da prije nije postojala hranjiva podloga koja bi omogućavala razlikovanje fizioloških skupina sulfid-producirajućih bakterija. Veći broj poraslih kolonija PSPB-a dobivenih na PCA nego na SIM podlozi vjerojatni je rezultat sastava korištenih peptona (Kahn 1924) te početnog sadržaja cisteina.



Slika 10. Shematsko filogenetsko stablo koje prikazuje raspoređenost različitih vrsta mikroorganizama te njihove metaboličke sposobnosti iskorištavanja sumpora.

PSPB mogu biti fakultativni anaerobi ili mogu imati obligatni anaerobni tip metabolizma. Stoga se postavlja pitanje u kojoj bi se koncentraciji kisika trebali inkubirati okolišni uzorci. Na izrađenu podlogu u ovoj studiji naciyepljeni su uzorci te inkubirani i u aerobnim i u anaerobnim uvjetima. Nastajanje sumporovodika otkrivalo se na hranjivim podlogama opažanjem zacrnjenja koja nastaju na podlozi u prisustvu soli određenih metala (željezo, olovo, bizmut), a crna boja tih područja posljedica je postojanja sulfida u tim metalima. Ta su se zacrnjenja pojavila već nakon perioda inkubacije od 24 sata, no njihov je broj rastao s trajanjem inkubacije do tri dana, a nakon tog perioda broj crnih kolonija nije se više povećavao. Rezultati su pokazali kako se razvilo više kolonija PSPB-a u aerobnim uvjetima kada su se inkubirali uzorci vode koji su imali veću koncentraciju otopljenog kisika. Kod

anoksičnih uzoraka sedimenta veći broj kolonija PSPB-a uzgojen je prilikom inkubacije uzoraka u anaerobnim nego u aerobnim uvjetima. Ovakvi rezultati govore u prilog širokom spektru respiratornih mogućnosti ove skupine bakterija. Anaerobni mikroorganizmi, za razliku od aerobnih, razvili su sustave za očuvanje energije kako bi se što uspješnije mogli prilagoditi okolišnom stresu i promjenama. Mikroorganizmi prilagođeni takvim varijabilnim uvjetima imaju mnoge biotehnološke primjene kao što su bioremedijacija, uklanjanje polutanata iz okoliša te biokatalize u kojima dolazi do stvaranja energije (Lowe i sur. 1993). Kod nekih anaerobnih bakterija, primjerice roda *Clostridium*, ukoliko dođe do prekida anaerobnih uvjeta dolazi i do ugibanja bakterija. Kod promatrane proteolitičke skupine sulfid-producirajućih bakterija u ovom istraživanju može se zaključiti kako ova skupina bakterija ima izrazitu sposobnost prilagodbe na okoliš u kojem se nalazi budući da su rezultati pokazivali veće brojeve poraslih kolonija na PCA hranjivoj podlozi obzirom na sredinu u kojoj su se bakterije nalazile. Stoga za prebrojavanje broja poraslih kolonija PSPB-a dobivenih simultanom inkubacijom okolišnih uzoraka u aerobnim i anaerobnim uvjetima preporuča se uzeti veći rezultat prilikom interpretacije rezultata. Uzimajući u obzir dobivene rezultate, tj. veći broj poraslih bakterijskih kolonija, novi tip hranjive podloge koji je razvijen te korišten u ovom istraživanju preporučuje se kao medij za otkrivanje fiziološke skupine proteolitičkih sulfid-producirajućih bakterija.

Za procjenu ukupne koncentracije proizvedenog sumporovodika u okolišu potrebno je uzeti u obzir njegovu proizvodnju i kod bakterija koje ne stvaraju sumporovodik proteolitičkom razgradnjom aminokiselina koje sadrže sumpor u svom sastavu. One ga crpe iz drugih izvora, primjerice sulfata i tiosulfata. Simultanim uzgojem bakterijskih kolonija na hranjivim podlogama koje sadrže sumpor u svim navedenim oblicima (protein, sulfat i tiosulfat) stekao bi se uvid u potencijal konačne koncentracije bakterijski proizvedenog sumporovodika.

Pored niže koncentracije otopljenog kisika ispitani uzorci sedimenta imali su i niže vrijednosti pH nego pripadajući uzorci vode, što je upućivalo na jači intenzitet procesa truljenja kod tih uzoraka. Procesi raspadanja organske tvari u sedimentu intenzivniji su nego u vodenom stupcu, što objašnjava veće dobivene brojeve kolonija PSPB-a u sedimentu nego u uzrocima vode. PSPB uvijek se mogu naći u vodama za koje je poznato da se u njih ulijevaju otpadne vode, ljudski ili životinjski otpad (Thompson 1921). Dotok velikih količina otpadnih tvari stvara povoljnu sredinu za bujanje PSPB-a. Stoga se izolacija PSPB-a iz okolišnih uzoraka može povezati s kvalitetom vode. Izoliranje PSPB-a iz okoliša također ukazuje i na

proizvodnju sumporovodika koji svojom toksičnošću predstavlja opasnost za vodene okoliše te životinjski svijet. Zbog svega navedenog razvoj novog tipa hranjive podloge omogućuje brzo otkrivanje fiziološke skupine PSPB-a što može upućivati na prisutnost organske tvari u okolišu.

5. ZAKLJUČAK

Predstavljena PCA podloga omogućava izolaciju većeg broja kolonija PSPB-a nego korištena kontrolna standardna SIM podloga.

Pomoću novog tipa podloge omogućen je rast i razvoj proteolitičke skupine sulfid-reducirajućih bakterija, što omogućava daljnja istraživanja fiziologije tih bakterija te njihovog utjecaja na okoliš.

Bakterije iz ove fiziološke skupine pokazuju mnoga zanimljiva svojstva adaptacije na različite okolišne uvjete, što ukazuje na mogućnost njihove primjene u biotehnologiji.

Inkubacija PCA podloga može se vršiti u aerobnim ili anaerobnim uvjetima kako bi se dobio što točniji broj kolonija PSPB-a iz okolišnih uzoraka.

Predstavljena metoda mogla bi naći primjenu u otkrivanju nakupljenih PSPB-a u okolišu gdje raspadanje proteina i proizvodnja sumporovodika ima značajnu ulogu.

Također bi otkrivanje PSPB-a pomoću ove metode moglo naći primjenu i u analizama kakvoće voda budući da je pronalazak PSPB-a u vodi povezan s ispuštanjem otpadnih voda u vodotokove, odnosno kvalitetom voda.

6. LITERATURA

- APHA: *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 19th Ed. APHA-AWWA-WPCF, New York 1995.
- BITTON G.: *Wastewater microbiology*, John Wiley & Sons, Inc., New Jersey 2005.
- CLIFFSNOTES.COM.: *The Sulfur Cycle*, 8 May 2008.
<<http://www.cliffsnotes.com/WileyCDA/CliffsReviewTopic/topicArticleId-23791,articleId-23787.html>>.
- DOE JOINT GENOME INSTITUTE, *Shewanella* genus.
<http://genome.jgpsf.org/finished_microbes/she_w/she_w.home.html>
- ENVIRONMENTAL LITERACY COUNCIL, *Sulfur Cycle*, October 31, 2006.
<<http://www.enviroliteracy.org/article.php/1348.html>>
- FENCHEL T., KING G.M., BLACKBURN T.H. *Bacterial biogeochemistry: the ecophysiology of mineral cycling*, Elsevier, Amsterdam 1998.
- GRAM L., TROLLE G., HUSS H.H.: Detection of specific spoilage bacteria from fish stored at low (0°C) and high (20°C) temperatures. *International Journal of Food Microbiology* 4, 1987.
- HAU H.H., GRALNICK J.A.: Ecology and biotechnology of the genus *Shewanella*. *Annual Review of Microbiology* 61, 2007.
- HOLT J.G., KRIEG N.R., SNEATH P.H.A., STALEY J.T., WILLIAMS S.T.: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Williams and Wilkins, Baltimore 1994.
- KAHN M.C.: Hydrogen sulphide production by anaerobic spore-bearing bacteria. *Journal of Bacteriology* 10, 1925.
- LITTLE B.J., RAY R.I., POPE R.K.: Relationship between corrosion and the biological sulfur cycle: A review. *Corrosion* 56, April 2000.
- LOWE S.E., JAIN M.K., ZEIKUS J.G.: Biology, Ecology, And Biotechnological Applications Of Anaerobic Bacteria Adapted To Enironmental Stresses In Temperature, pH, Salinity, Or Substrates. *Microbiological Reviews* 57, June 1993.
- NEALSON K.H.: Sediment bacteria - Whos There, What are thea doing, And whats new. *Annual Review of Earth & Planetary Sciences* 25, 1997.

- OKABE S., ITO T., SUGITA K., SATOH H.: Succession of internal sulfur cycles and sulfur-oxidizing bacterial communities in microaerophilic wastewater biofilms. *Applied & Environmental Microbiology* 71, May 2005.
- OVERMANN J., GEMERDEN H.V.: Microbial interactions involving sulfur bacteria: implications for the ecology and evolution of bacterial communities. *FEMS Microbiology Reviews* 24, 2000.
- SKJERDAL O.T., LORENTZEN G., TRYLAND I., BERG J.D.: New method for rapid and sensitive quantification of sulphide-producing bacteria in fish from arctic and temperate waters. *International Journal of Food Microbiology* 93, June 2004.
- SOROKIN D.Y.: Influence of thiosulfate on the growth of sulfate-producing sulfur-oxidizing heterotrophic bacteria from the Black sea in continuous culture. *Microbiology* 63, May-June 1994.
- STATSOFT INC.: Statistica (Data analysis software system) version 7.1, 2005.
- STILINOVIĆ B., FUTAC N.: Methods of study the bacterial production of hydrogen sulphide from proteins. *Biologia (Bratislava)* 45, 1990.
- THOMPSON L.S.: The group of sulphide producing bacteria. *Journal of Medical Research* 42, 1921.
- WIKIPEDIA.COM, <<http://en.wikipedia.org/wiki/Sulfur>>.